

UUELLEEN OHJELMOIDUISTA ERITTÄIN MONIKY- KYISISTÄ KANTASOLUISTA ERILAISTETTUIEN PIT- KÄ QT1 –SPESIFISTEN KARDIOMYOSYYTTIEN VI- DEOANALYYSI

Tiina Myyry

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Tampereen yliopisto

Lääketieteen ja biotieteiden tiedekunta

Sydänryhmä

Marraskuu 2017

Sydänryhmä

MYYYRY TIINA: UUELLEEN OHJELMOIDUISTA ERITTÄIN MONIKYKYISISTÄ KANTASOLUISTA ERILAISTETTujen PITKÄ QT1 -SPESIFISTEN KARDIOMYOSYYTTIEN VIDEOANALYYSI

Kirjallinen työ, 25 s.

Ohjaaja: tutkijatohtori Mari Pekkanen-Mattila, professori Katriina Aalto-Setälä

Avainsanat: uudelleen ohjelmoitu erittäin monikykyinen kantasolu, sydäntautimallinnus, pitkä QT1 -oireyhtymä

Mikä tahansa ihmisen somaattinen solu voidaan ohjelmoida uudelleen erittäin monikykyiseksi eli pluripotentiksi kantasoluksi. Näin saadut indusoidut erittäin monikykyiset kantasolut (iPS-solut) lisääntyvät laboratorio-olosuhteissa periaatteessa loputtomasti ja niistä voidaan erilaistaa mitä tahansa ihmisen solutyyppisiä, esimerkiksi sydänlihassoluja. Tässä tutkimuksessa mallinnetaan potilasspesifisistä iPS-soluista erilaistetuilla sydänlihassoluilla pitkä QT1 -oireyhtymää videoanalyysimenetelmän avulla. Solut ovat peräisin kolmelta eri potilaalta, joista kaksi on oireisia ja yksi on oireeton.

Pitkä QT-oireyhtymä on perinnöllinen tai jonkin ulkoisen tekijän, kuten lääkkeen tai elektrolyyttihäiriön, aiheuttama sydänsairaus. Potilailla on kohonnut riski saada hengenvaarallisia kammioperäisiä rytmihäiriöitä. Sairaus havaitaan sydänsähkökäyrästä pidentyneenä QT-aikana. Perinnöllisen oireyhtymän muodon aiheuttaa geenimutaatio. Tässä tutkimuksessa analysoidaan kahta eri mutaatiota I_{KS} -kaliumionikanavaa koodaavassa geenissä (Fin A ja Fin B –mutaatiot). Kyseessä on pitkä QT -oireyhtymän alatyypiksi yksi eli LQT1.

Tutkimuksessa havaittiin videoanalyysimenetelmällä ero terveiden kontrollisolulinjojen solujen ja sairaiden, pitkä QT1 -oireyhtymän geenivirhettä kantavien solulinjojen solujen välillä; sairaiden solujen relaksaation alku on viivästynyt ja ero on tilastollisesti merkitsevä. Tulokset ovat linjassa potilaiden oireiston kanssa siten, että oireilevien potilaiden solujen relaksaation alku on viivästyneempi kuin oireettoman potilaan solujen relaksaation alku.

SISÄLLYSLUETTELO

1.	JOHDANTO	1
1.1	Kantasolut.....	1
1.2	Uudelleen ohjelmoidut erittäin monikykyiset kantasolut eli iPS-solut	1
1.3	Sydänerilaistus iPS-soluista	3
1.4	Sydäntautimallinnus	4
1.5	Pitkä QT-oireyhtymä (LQTS)	5
2.	MENETELMÄT	8
2.1	Eettinen hyväksyntä	8
2.2	Aineisto	8
2.3	Uudelleen ohjelmointi kantasoluiksi ja erilaistus sydänlihassoluiksi	9
2.4	Immunovärjäys.....	9
2.5	Videoanalyysi.....	10
2.6	Tilastollinen analyysi	11
3.	TULOKSET	12
3.1	Videoanalyysi ja tilastollinen testaus	12
3.2	Immunovärjäys.....	17
4.	POHDINTA	18
	LÄHTEET	22

1. JOHDANTO

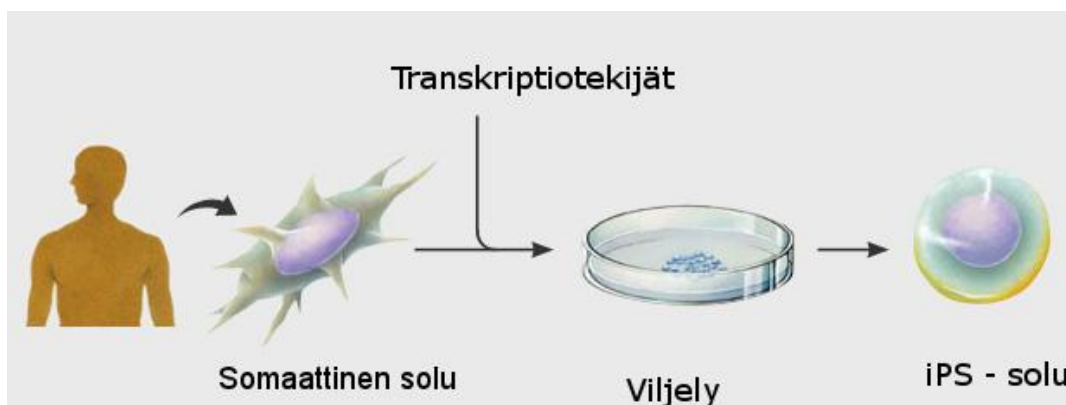
1.1 Kantasolut

Kantasolut ovat soluja, jotka kykenevät jakautumaan symmetrisesti tuottaen kaksi täysin identtistä kantasolua. Kantasolut voivat myös jakautua epäsymmetrisesti tuottaen yhden kantasolun ja yhden solun, joka alkaa erilaistua joksikin muuksi soluksi. (1)

Kantasolut jaotellaan niiden erilaistumiskyvyn mukaan (2, 3). Totipotentit eli kaikki kykenevät kantasolut pystyvät erilaistumaan miksi tahansa elimistön soluiksi ja alkion ulkopuolisiksi, ns. extra-embryonaalisiksi soluiksi (3). Hedelmöittyneen munasolun solut ovat totipotentteja morulan 8-soluasteelle asti, sen jälkeen niistä tulee pluripotentteja eli erittäin monikykyisiä kantasoluja (3). Pluripotentit kantasolut voivat erilaistua kaikiksi alkiokerroksiksi eli kaikiksi elimistön soluiksi, mutta eivät enää istukan ja sikiökalvojen soluiksi (3). Multipotenttien eli monikykyisten kantasolujen erilaistumispotentiaali on rajallisempi (3). Aikuisessa ihmisessä on multipotentteja kantasoluja, esimerkiksi maksan kantasoluja ja luuytimen kantasoluja (4).

1.2 Uudelleen ohjelmoidut erittäin monikykyiset kantasolut eli iPS-solut

Ihmisen somaattiset solut voidaan ohjelmoida uudelleen erittäin monikykyisiksi eli pluripotentteiksi kantasoluiksi varsin yksinkertaisesti esim. neljän kantasoluille tärkeän transkriptiotekijän Oct 3/4, SOX2, Klf4 ja c-Myc avulla. Nämä transkriptiotekijät ovat tärkeitä alkion kantasoluille. Näin luoduilla indusoiduilla pluripotentteilla kantasoluilla (iPS-solut) on alkion sisäsolumassan solujen kaltaisen morfologia, proliferaatiotapa, pintaproteiinit ja lisäksi ne ilmentävät alkion sisäsolumassan (hESC, human embryonic stem cells) solujen kaltaisia merkkigeenejä, joita myöhempien vaiheiden kypsissä aikuisen soluissa ei enää ilmene. Lisäksi iPS-solut kykenevät erilaistumaan kaikkien kolmen alkiokerroksen (endodermi, mesodermi, ektodermi) solutyypeiksi soluviljelyolosuhteissa. iPS-solut lisääntyvät soluviljelyolosuhteissa periaatteessa loputtomasti. (5)



Kuva 1. Yksinkertaistettu kuva indusoitujen pluripotenttien kantasolujen (iPS-solu) tekemisestä. Mukailtu <https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/e/faq/faq2.html>.

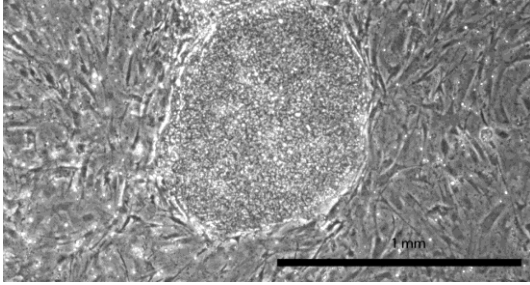
Tarvittavien transkriptiotekijöiden viemiseksi uudelleen ohjelmoitaviin soluihin on olemassa useita tekniikoita (5, 6). Tekniikat eroavat esimerkiksi sen mukaan, integroituvatko transkriptiotekijät isäntäsolun genomiin vai eivät. Ensimmäisinä käyttöön otettiin lenti- ja retroviruksia, jotka integroivat oman genominsa ja sen mukana transkriptiotekijät sattumanvaraiseen kohtaan kohdesolun genomia (6). Tähän liittyy riski siitä, että liittymiskohdan viereisten geenien luenta häiriintyy tai muuttuu ja riski pluripotenssigeenien aktivoitumisesta uudestaan myöhemmin, kun se ei ole enää tarkoituksenmukaista (7). Tulevaisuuden sovellutuksia, kuten kudossiirteitä, varten on pyritty kehittämään kuljettimia, jotka eivät muuta solun omaa genomia (niin kutsutut integroimattomat kuljettimet). Esimerkkejä uudemmissa, integroimattomista ja siten vain ohimenevästi transkriptiotekijöitä ilmentävistä menetelmistä ovat adenovirukset, plasmidit sekä sendai-virus, tai eräs vaihtoehto on viedä synteettinen lähetti-RNA suoraan soluun (8, 9, 10, 11, 12). Näistä ingeroimattomista menetelmistä laajimmin ovat käytössä plasmidi-tekniikat, sendai-virus ja synteettiset lähetti-RNA:t (7).

Sendai-virus on RNA-virus, joka ei siirrä omaa genomiaan osaksi isäntäsolun genomia. Sendai-virustekniikka on yksi uudemman polven turvallisemmista, ei-integroivista uudelleenohjelmointitekniikoista. Sendai-kuljetin on tehty liittämällä transkriptiotekijät viruksen genomiin alukkeiden ja säätelyalueiden kanssa. Kun sendai-virus on infektoitu somaattiseen soluun, se replikoi yksijuosteisenä negatiivisen RNA:n solun sytoplasmassa episomaalisena, eikä siis tumassa. Proteiinit koodautuvat RNA:sta ilman DNA-välivaihetta eikä sendai-viruksen oma genomi liity osaksi isäntäsolun genomia missään vaiheessa eikä edes kulkeudu tumaan. (8, 9)

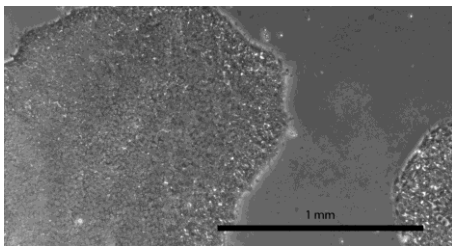
Plasmiditekniikkaa käytettäessä soluihin viedään transkriptiotekijät synteettisissä, solunjakautumisten mukana monistuvissa plasmideissa, joista transkriptiotekijät aktivoituvat eikä tässäkään tekniikassa integroidu vierasta DNA:ta isäntäsolun genomiin. Plasmidit häviävät uudelleen ohjelmoituista valmiista iPS-soluista spontaanisti lähes aina. (11)

Tarvittavista transkriptiotekijöistä voidaan myös tehdä synteettiset lähetti-RNA-molekyylit ja viedä ne uudelleen ohjelmoitaviin soluihin. Tällöin solussa lähetti-RNA:sta luetaan transkriptiotekijät suoraan toimiviksi proteiineiksi ja jälleen ohjelmoituminen käynnistyy ilman solun oman genomien muokkaantumista. (12)

iPS-solujen soluviljelyssä voidaan pitää kantasoluja erilaistumattomina, jotta solujen lukumäärä saadaan riittävän suureksi ennen erilaistusta tai solujen säilyttämistä varten. Soluja voidaan säilyttää myös pakastamalla. iPS-solut voivat kasvaa tukisolujen, kuten hiiren alkion fibroblastien (MEF, mouse embryonic fibroblasts) päällä tai ilman tukisoluja ("feeder free") kaupallisella ekstrasellulaarilustalla, esimerkiksi Matrigel^R- tai Geltrex^R-alustalla (1). Kaupallisten alustojen proteiinit ovat samankaltaisia ekstrasellulaaritalan proteiineja, joita normaalissa alkionkehityksessä esiintyy (13). Viljelymenetelmiä on kehitetty turvallisiksi, kustannustehokkaiksi ja helppokäyttöisiksi (13).



Kuva 2. Esimerkki soluviljelykuopassa kasvavasta iPS-solujen koloniasta. Tässä kuvassa iPS-solut kasvavat tukisoluina toimivien hiiren alkion fibroblastien (MEF, mouse embryonic fibroblasts) päällä. Kuva on otettu Nikon eclipse TS 100 valomikroskoopin avulla 4-kertaisella suurennoksella ja tietokoneen JAI Camera Control Tool-ohjelmalla.



Kuva 3. Esimerkki soluviljelykuopassa kasvavasta iPS-solujen koloniasta. Tässä kuvassa solut kasvavat suoraan Geltreks^R-alustalla ilman tukisoluja ("feeder free"). Kuva on otettu Nikon eclipse TS 100 valomikroskoopin avulla 4-kertaisella suurennoksella ja tietokoneen JAI Camera Control Tool- ohjelmalla.

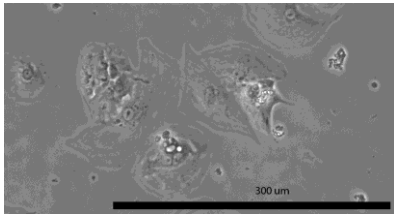
1.3 Sydänerilaistus iPS-soluista

Erilaistamiseen on olemassa erilaisia menetelmiä, kuten esimerkiksi erilaistaminen END2-solujen (mouse visceral endodermal- like cells) yhteisviljelmissä (14, 15) tai käyttämällä sydämen kehitystä ohjaavia kasvutekijöitä tai pienmolekyylejä (16).

Hiiren END2-solut tukevat erilaistumista kohti endo- ja mesodermaalista suuntaa. END2-solujen aikaansaaman erilaistumisen tarkkaa mekanismia ei tunneta. END2-solut kykenevät ainakin poistamaan liuoksesta insuliinia, jonka tiedetään estävän sydänlihassoluksi erilaistumista ensimmäisen viiden päivän aikana. Insuliini vähentää endo- ja mesodermaalista erilaistumista ja tukee ektodermiä erilaistumista. (14, 15)

Pienmolekyylierilaistusmenetelmä perustuu sydämen kehitystä ohjaavien solujen signaalireittien säätelyyn erilaisten molekyylien avulla (16). Esimerkiksi signaalireitit Wnt/ β -kateniini ja aktiviini A/BMP 4 (bone morphogenetic protein 4) säätelevät sydämen kehitystä (17). Wnt/ β -kateniini-signalointia estämällä tarkoissa soluviljelyolosuhteissa kahdella eri pienmolekyyllillä saadaan iPS-soluista erilaistettua sydänlihassoluja siten, että muodostuu yksikerroksinen sykkivä solumatto (16).

Solumatto tai –rykelmät hajotetaan entsyymaattisesti yksisolusteelle analyysensä varten. Tässä tutkimuksessa käytetyt pienmolekyylit ovat CHIR99021 ja IWP2 (16).



Kuva 4. Esimerkki soluviljelykuopassa kasvavista sydänlihassoluista, jotka ovat olleet erilaistuksessa 51 päivää. Kuva on otettu Nikon eclipse TS 100 mikroskoopin avulla 20-kertaisella suurennoksella ja tietokoneen JAI Camera Control Tool-ohjelmalla.

1.4 Sydäntautimallinnus

IPS-soluista voidaan erilaistaa kaikkia ihmisen sydänlihassolutyyppejä, eli kammio- ja eteisperäisiä sekä johtoratajärjestelmän soluja (18). Erilaistamisen jälkeen solujen nähdään mikroskoopilla sykkivän spontaanisti (18, 19). Muita solujen karakterisointi- eli tunnistamistutkimuksia ovat esimerkiksi RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) ja immunovärjäys (1). RT-PCR:llä tutkitaan geenien ilmentymistä ja immunovärjäyksellä solussa olevia proteiineja (1).

iPS-soluihin pohjautuvan sydäntautimallinnuksen etuna on potilasspesifisyys, joka mahdollistaa patologisten mekanismien molekyylitason tunnistuksen sekä edelleen turvallisen lääketestauksen ja sen kautta yksilölliset lääkehoidot (20). iPS-solun ja siitä erilaistetun sydänlihassolun genomi on täysin identtinen alkuperäisen, solun luovuttaneen potilaan genomin kanssa, mikä mahdollistaa täysin yksilöidyn tautimallinnuksen (19, 20). Jos sairaus johtuu esimerkiksi virheestä sydänlihassolun toimintaan vaikuttavassa geenissä, potilaasta peräisin olevassa erilaistetussa sydänlihassolussa on sama geenivirhe (20). Lisäksi erilaistetut sydänlihassolut käyttäytyvät sairauden kaltaisesti, eli sairaus ilmenee niissä ja farmakologisessa testauksessa lääkeaineet aikaansaavat samankaltaisia vasteita kuin mitä ne aikaansaavat potilaissa, terveissä henkilöissä ja aikuisen sydäimestä eristetyissä sydänlihassoluissa (21, 22). Tulevaisuudessa haaveillaan myös monipuolisista iPS-soluihin perustuvista hoitomahdollisuuksista ja regeneroivasta lääketieteestä (23). iPS-tautimallinnuksella päästään lähemmäs oikeaa ihmisen sydämen solujen toimintaa kuin hiirimalleja käyttämällä (20).

Sydäntautimallinnuksessa käytetään myös hiirimalleja. Hiiren ja ihmisen sydänlihassolujen rakenteessa on eroa, muun muassa sarkomeerien myosiiniraskasketjut eroavat toisistaan (24). Hiiren sydämen syke on levossa noin 10 kertaa korkeampi kuin ihmisen sydämen syke (20). Hiiren sydämen kammioli Hassolujen aktiopotentiaali on lyhyempi, repolarisaatio on nopeampi ja aktiopotentiaalilin plateau (Kuva 5) puuttuu (24). Näiden asioiden takia iPS-solumallinnus on rytmihäiriösairauksissa hiirimallia parempi vaihtoehto (20).

Alkion kantasolumallinnukseen liittyy eettinen ongelma, koska alkio tuhotaan ja siitä periaatteessa olisi voinut kehittyä ihmisyksilö (3). Suomessa lääketieteelliseen tutkimukseen saa käyttää vain hedelmöityshoidoissa ylijääneitä alkioita, eli alkioita ei saa tehdä tutkimustarkoituksia varten (25). Alkion kantasolumallinnuksen avulla on saatu vain muutamia harvinaisia yhden geenivirheen sisältäviä soluja eikä fenotyyppikorrelaatiota (potilaan oireita ja kliinistä taudinkuvaa) saada, koska kyseisestä alkioista ei koskaan kehittynyt ihmisyksilöä (20). Tällöin alkion kantasolumallinnus ei tarjoa myöskään personoidun lääketieteen mahdollisuuksia, joita iPS-tautimallinnuksella saavutetaan. Alkion kantasoluista erilaistetuilla sydänlihassoluilla voidaan kuitenkin mallintaa sydänlihassolujen toimintaa sekä perusbiologiaa ja niitä voidaan käyttää turvallisuus- ja lääketestauksissa (20).

iPS-tautimallinnuksen haasteet ja ongelmat liittyvät kantasolujen indusointitapoihin, solujen erilais-
tamisen onnistumiseen eli solujen kypsyyteen ja siihen, että tutkitaan vain soluja eikä elintä kokonaisuutena (26). Solujen epäkypsyys nähdään suurimpana haasteena, sillä erilaistetut sydänlihassolut muistuttavat enemmänkin sikiön sydänlihassoluja kuin aikuisen kypsiä soluja, muun muassa aktiopotentiaalit muistuttavat 16 viikkoa vanhan alkion sydämen solujen aktiopotentiaaleja (20). Tällöin tautimallinnuksen kannalta on haasteellista tutkia sairauksia, jotka puhkeavat yksilössä vasta myöhemmässä iässä (20). iPS-soluista erilaistetut sydänlihassolut voivat olla morfologisesti poikkeavia (sydänlihassolut ovat normaalisti haaroittuneita ja monitumaisia), sarkomeerirakenteet ovat epätäydellisiä ja T-tubulusrakenteissa on vajavaisuuksia (27). Solutasolla tutkittaessa huomiot-
ta jää elimen toiminnan kokonaisuus ja elimistön vaikutus elimen toimintaan (25).

iPS-tautimallinnus on sydänsairauksissa käyttökelpoinen varsinkin silloin, kun sairauden tausta on vahvasti geneettinen ja tämä geneettinen tausta on tunnistettu, kuten esimerkiksi geenivirheet pitkä QT-oireyhtymän (LQTS) takana (20). Jos sairaus vaikuttaa erityisesti johonkin tiettyyn sydänlihassolutyyppiin (eteissolu, kammiosolu, johtoratajärjestelmän solu) on tarpeen saada tunnistettua ja eristettyä viljelmästä kyseisen sairauden kannalta relevantit solut (20). Tunnistus ja lajittelu voidaan tehdä aktiopotentiaal-
in muodon ja ominaisuuksien (28) perusteella patch clamp -menetelmällä (21) ja varmentaa geeniekspression tutkimisella RT-PCR-menetelmällä (22).

iPS-tautimallinnukseen liittyvät eettiset kysymykset eroavat alkionkantasolumallinnukseen liittyvis-
tä eettisistä kysymyksistä, koska iPS-soluja valmistettaessa ei tarvitse kajota ihmisalkioon (23). Tärkeää on, että solujen luovuttajan yksityisyys säilyy. Julkaisuissa ei esitetä mitään luovuttajan tunnistamisen mahdollistavaa tietoa ja solulinjoja käsitellään koodattuina. Luovuttaja antaa kirjallisen luvan solujen tutkimiseen. Eettisesti huomioitavaa on myös, että luovuttajan solusta tehdyn iPS-solun genomi on identtinen luovuttajan genom-
in kanssa.

1.5 Pitkä QT-oireyhtymä (LQTS)

Pitkä QT -oireyhtymä (LQTS, long QT syndrome) on yleisin perinnöllinen rytmihäiriösairaus, maailmanlaajuinen esiintyvyys on 1:2 000-5 000, mutta Suomessa geneettinen esiintyvyys on 1:250 (1). Oireyhtymä voi ilmetä synkopeekohtauksina ja EKG:ssä pidentyneenä QT-aikana tai jopa äkillisenä sydämenpysähdyksenä (29). Sairaus periytyy vallitsevasti (30). Perinnöllisyyden lisäksi sairaus voi ilmetä lääkeaineen sivuvaikutuksena tai vaikean elektrolyyttihäiriön seurauksena, jolloin sitä kutsu-

taan hankituksi (1). Lääkkeen sivuvaikutuksena LQT-oireyhtymä voi tulla todennäköisemmin, jos henkilöllä on sairaudelle altistava geenimutaatio, mutta ei normaalitilanteessa oireita (1, 30, 31, 32).

Perinnöllinen LQT-oireyhtymä johtuu mutaatioista sydänlihassolujen solukalvojen ionikanavia (31) koodaavissa geeneissä. Kolme yleisintä oireyhtymän alatyyppejä ovat LQT1, LQT2 ja LQT3. Yleisimmässä (noin 50 % tunnetuista tautitapauksista) alatyypissä LQT1 mutaatio on KCNQ1- geenissä, joka koodaa sydänlihassolun hitaan ("slow delayed rectifier") kaliumioni (K^+) kanavan (I_{KS}) rakenneproteiinin alfa-alayksikköä (33). Potilaan synkopeeoire liittyy useimmiten fyysiseen rasitukseen, uimiseen, tai joskus myös tunnekuuhuun kuten kiihtymykseen. (34)

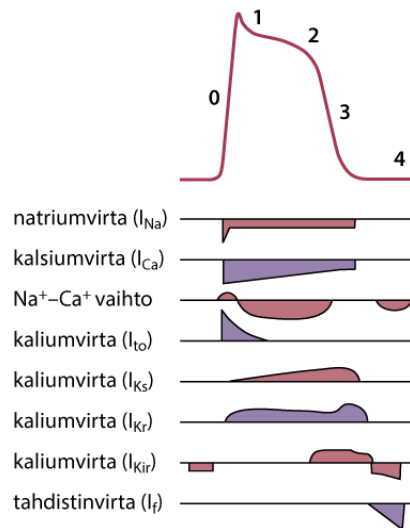
Toiseksi yleisimmässä (noin 35 % tunnetuista tautitapauksista) alatyypissä LQT2 mutaatio on KCNH2 (toinen nimi HERG) -geenissä, joka koodaa sydänlihassolun nopean ("rapid delayed rectifier") kaliumioni K^+ kanavan (I_{Kr}) rakenneproteiinin alfa-alayksikköä. Potilaan synkopeeoireet liittyvät keskimäärin useammin säikähtämiseen tai tunnekuuhuun kuin fyysiseen rasitukseen (34). Heittäminen säikäyttävään ääneen on LQT2 potilaalle ominainen oire. (33)

Kolmanneksi yleisimmässä (noin 5 % tunnetuista tautitapauksista) alatyypissä LQT3 mutaatio on SCN5A-geenissä, joka koodaa natriumkanavan I_{Na} rakenneproteiinin alfa-alayksikköä 5. Potilaat oireilevat useimmiten levossa. (33)

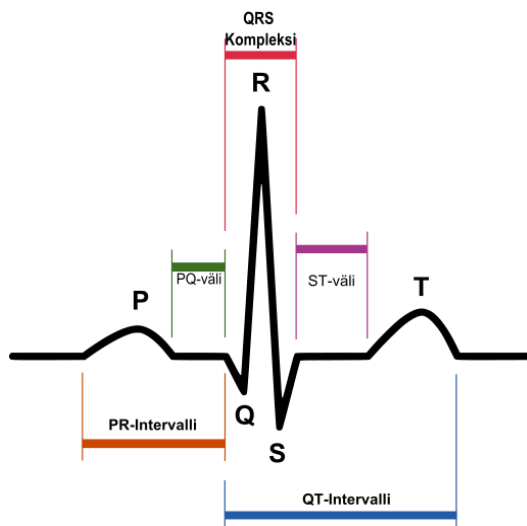
Tässä tutkimuksessa oireyhtymä on LQT1, eli mutaatiot ovat geenissä KCNQ1 ja aiheuttavat muutoksia repolarisoivan I_{KS} -kaliumionikanavan alfa-alayksikköön. Mutaatiot ovat suomalaiset valtamutaatiot Fin A ja Fin B, jotka yhdessä kahden muun KCNH2 (HERG) geenin mutaation kanssa kattavat 73 % kaikista perinnöllisistä LQT oireyhtymätapauksista Suomessa (35). Fin A on pistemutaatio, jossa aminohappoketjun 589. aminohappo on vaihtunut glysiinistä asparagiiniksi, mutaatio lyhennetään G589D. Fin B -mutaatio on intronimutaatio ivs7-2A>G (intronin on geenissä sellainen osa, joka ei koodaa aminohappoja), joka aiheuttaa muutoksia lähetti-RNA:n silmikointiin.

Sydänlihassolujen mekaanisen toiminnan perusta on sydänlihassolun sähköinen toiminta ja kalsiumaineenvaihdunta linkittää sähköisen ja mekaanisen toiminnan. Kuvassa 5 esitetään sydämen kammioli hassolun aktiopotentiaali ja sen eri vaiheissa auki olevista ionikanavista kulkevat ionivirrat. Aktiopotentiaalin aikana solun kalvojännite ensin kasvaa (depolarisaatio) ja sitten palautuu takaisin lepotasolle (repolarisaatio). Kuvasta 5 nähdään, että tässä tutkimuksessa kohteena oleva I_{KS} -kanava on normaalisti auki repolarisaatiovaiheessa. (35)

EKG (sydänsähkökäyrä, elektrokardiogrammi) kuvaa koko sydämen sähköistä toimintaa. Kuvassa 6 on klassinen havainnollistus EKG:stä, todellisuudessa erilaisia EKG-kytkentöjä on yli 12 ja normaalin käyrän muoto riippuu kytkennästä (eli siitä mistä suunnasta kytkentä kuvastaa sydäntä) (36). LQTS:ssa niiden nimen mukaisesti QT-intervalli on poikkeavan pitkä (29). Usein käytetään sykkeen suhteen korjattua QT-aikaa eli QTc:tä, koska syketiheyden kasvaessa QT-aika lyhenee (yksittäisen supistuksen on tapahduttava nopeammin) ja syketiheyden laskiessa QT-aika vastaavasti kasvaa (37). Eli QTc:ssä syketiheyden vaikutus on poistettu ja eri QTc-aikoja voidaankin vertailla keskenään. QTc- aika lasketaan esimerkiksi niin kutsutulla Bazettin kaavalla, jossa $QTc = QT / (RR-väli)^{1/2}$ (37). RR-väli on EKG:ssä R-piikkien välinen aika sekunteina (Kuva 6) (37).



Kuva 5. Sydämen kammoli hassolun aktiopotentiaali ja sen eri vaiheissa avoinna olevista ionikanavista kulkevat ionivirrat. Numerot kuvaavat aktiopotentiaalin vaiheet; 0= nopea depolarisaatio, 1 = repolarisaatio, 2 = tasannevaihe eli plateau, 3 = nopea repolisaatio, 4 = lepopotentiaali. Kuva otettu <http://www.oppiporrtti.fi/op/kak01225/do>



Kuva 6. EKG. P-aalto kuvaa eteisten depolarisaatiota. PQ-väli on aika, jona depolarisaatio leviää eteiskammiokimppua pitkin kammioihin. QRS-kompleksi kuvaa kammioiden depolarisaatiota. ST-väli on aika, jona kammiot pysyvät supistuneina. T-aalto kuvaa kammioiden repolarisaatiota. QT-intervalli (QRS-kompleksin alusta T-aallon loppuun) kuvaa sekä depolarisaatiota että repolarisaatiota. Kuva otettu <http://kopowiki.wikispaces.com/Syd%C3%A4men+toiminta+ja+verisuonet>

2. MENETELMÄT

2.1 Eettinen hyväksyntä

Tutkimus tehdään lääketieteen ja biotieteiden tiedekunnan sydäntutkimusryhmässä, joka on saanut puoltavan eettisen lausunnon iPS-solujen tutkimukseen ja käyttöön Pirkanmaan sairaanhoitopiirin eettiseltä komitealta (R08070). Ihobiopsian luovuttaneilta on kirjallinen hyväksyntä.

2.2 Aineisto

Aineistona on videoita kuudesta eri iPS-solulinjasta erilaistetuista sydänlihassoluista (Taulukko 1). iPS-solut on uudelleenohjelmoitu neljän eri henkilön fibroblasteista. Sairaant solulinjat UTA.00208.LQT1 ja UTA.00211.LQT1 on uudelleen ohjelmoitu saman potilaan (potilas 1) fibroblasteista, näissä soluissa ja potilaalla on KCNQ1- geenissä Fin A -mutaatio. Fin A -mutaatio on pistemutaatio (G589D), jossa peptidin 589:äs aminohappo on vaihtunut glysiinistä asparagiiniksi (38). Tämä sama Fin A -mutaatio on potilaalla 2 ja hänen soluistaan tehty solulinja on UTA.00303.LQT1. Solulinja UTA.00118.LQT1 on potilaalta (potilas 3), jolla on KCNQ1- geenissä Fin B -mutaatio. Fin B -mutaatio $ivs7-2A>G$ on intronimutaatio, joka aiheuttaa muutoksia silmikointiin (38). Tässä työssä näistä mutaatioista puhuttaessa käytetään tästä eteenpäin termejä Fin A ja Fin B. Verrokkilinjan UTA.04602.WT (WT = wild type) solut ovat peräisin terveeltä naishenkilöltä.

Solulinjat UTA.00208LQT1 ja UTA.00211.LQT1 ovat 46-vuotiaalta naishenkilöltä (potilas 1), jolla on ollut synkopeekohtauksia ja hänen QTc on 464 millisekuntia. Potilas 2 (solulinja UTA.00303.LQT1) on oireeton ja hänen QTc on 428 ms. Potilaalla 2 on oireyhtymän diagnoosi, koska diagnoosi asetetaan oireista ja QTc:stä riippumatta potilaalle, jolla todetaan oireyhtymälle yksiselitteisesti patologiseksi tiedetty geenimutaatio, kuten tässä tapauksessa Fin A -mutaatio. Solulinja UTA.00118.LQT1 on potilaalta (potilas 3), jolla on ollut huimausta, näkökentän hämärtymistä ja synkopeekohtauksia sekä QTc 489 millisekuntia. Potilaat käyttävät beetasalpaajalääkitystä. Lepotilanteessa potilailta ei löydetä EKG:stä QT-ajan epäsäännöllisyyksiä. Verrokkisolut (linja UTA.04602.WT) ovat 55-vuotiaalta naiselta, jolla ei ole mutaatiota I_{KS} -ionikanavaa koodaavissa geeneissä, ja hänen QTc on 406 millisekuntia.

Taulukko 1. Taulukossa on solulinja ja tutkimuksessa analysoitujen solujen lukumäärä, solulinjan solut luovuttanut henkilö ja soluissa oleva, pitkä QT1 -oireyhtymään liittyvä mutaatio, alkuperäiset solut luovuttaneen potilaan oireet sekä solulinjan sydänerilaistukseen käytetty erilaistusmenetelmä.

	Solujen lukumäärä	Luovuttaja/potilas	Mutaatio KCNQ1-geenissä	Potilaan oireet	Sydänerilaistusmenetelmä
UTA.04602.WT	30	verrokki	ei		END2
UTA.04602.WT	7	verrokki	ei		pienmolekyylierilaistus
UTA.00208.LQT1	22	potilas 1, QTc 464 ms	Fin A	synkopeekoh- tauksia	END2
UTA.00211.LQT1	16	potilas 1, QTc 464 ms	Fin A	synkopeekoh- tauksia	END2
UTA.00303.LQT1	23	potilas 2, QTc 428 ms	Fin A	oireeton	END2
UTA.00118.LQT1	14	potilas 3, QTc 489 ms	Fin B	huimausta, näköoireita, synkopeekoh- tauksia	END2

2.3 Uudelleen ohjelmointi kantasoluiksi ja erilaistus sydänlihassoluiksi

Tämän tutkimuksen solut on sydänryhmä jo aiemmin uudelleen ohjelmoinut iPS-soluiksi sendai-virus ohjelmointimenetelmällä ja karakterisoinut ne (19). iPS-solut on erilaistettu sydänlihassoluiksi END2-erilaistusmenetelmällä (14). UTA.04602.WT-pime solut on erilaistettu pienmolekyylierilaistusmenetelmällä (16).

2.4 Immunovärjäys

Immunovärjäys on yksi solujen karakterisointikeinoista. Värjäämällä tutkitaan, ovatko solut sydänlihassoluja vai joitakin muita soluja sen perusteella, mitä proteiineja soluissa on. Tutkimuksessa värjättiin verrokkilinjan UTA.04602.WT soluista sydänlihassoluille ominaista proteiinia troponiini T. Troponiini T on sarkomeerin (solunsisäisen supistumisyksikön) osa. Lisäksi värjättiin solujen tumia dapi-väriaineella.

Kaivoissa kasvavat solukoloniat käsiteltiin eli ns. fiksoitiin 4 prosenttisella paraformaldehydillä (PFA) (1 ml) 20 minuutin ajan. Ennen fiksointia ja sen jälkeen kaivot pestiin kaksi kertaa 5 minuutin ajan fosfaattipuskuroidulla liuoksella (PBS) (1 ml). Viimeisen pesun jälkeen PBS:ää jätettiin kuoppiin 1 ml ja soluja säilytettiin 4 °C:ssa viikko ennen varsinaisen värjäysprotokollan aloittamista. Fiksointi pysäyttää solun aineenvaihdunnan ja sykin, mutta solurakenteet säilyvät.

Seuraavassa vaiheessa kaivoihin lisätään liuosta, joka sisältää sellaisia molekyylejä, jotka peittävät maljan tyhjät kohdat ja estävät myöhemmin lisättävien vasta-aineiden epäspesifistä sitoutumista maljalla. Fosfaattipuskuroitu liuos pipetoidaan ensin pois ja kaivoihin pipetoidaan tilalle fosfaattipuskuroitua liuosta, jossa on 10 % NDS:ää (normal donkey serum), 0,1 % TritonX-100^R ja 1 % BSA (bovine serum albumine). TritonX-100^R vaikuttaa sydänlihassolun solukalvoon tehden siihen reikiä siten, että myöhemmin lisättävät vasta-aineet pääsevät solun sisään. BSA (bovine serum albumine) ja NDS (normal donkey serum) sitoutuvat kaikkialla maljalla pintoihin kilpaillen sitoutumisesta myöhemmin lisättävien vasta-aineiden kanssa ja estävät siten vasta-aineiden epäspesifistä sitoutumista. Tämän liuoksen annetaan vaikuttaa 45 minuuttia huoneenlämmössä. Sitten liuos pipetoidaan pois ja kaivot pestään kerran fosfaattipuskuroidulla liuoksella, jossa on 1 % NDS, 0,1 % TritonX-100^R ja 1 % BSA.

Primääriset vasta-aineet sitoutuvat suoraan soluissa oleviin tutkittaviin proteiineihin, mutta niissä ei ole fluoresoivia merkkiaineita. Primääristen vasta-aineiden liuosta valmistetaan 2000 µl pohjana PBS, jossa on 1 % NDS, 0,1 % TritonX-100^R, 1 % BSA sekä käytetty primäärinen vasta-aine anti-troponiini (tropT Goat, 1:2000, Abcam USA, ab 64623). Tätä primääristen vasta-aineiden liuosta pipetoidaan 150 µl yhtä kaivoa kohti ja inkuboidaan yön yli 4 °C:ssa.

Seuraavana päivänä primääristen vasta-aineiden liuos pipetoidaan pois ja kaivot pestään 3 kertaa 5 minuuttia 300 µl PBS:llä, jossa 1 % BSA:ta. Sekundääriset vasta-aineet sitoutuvat primäärisiin vasta-aineisiin ja sekundääriset vasta-aineet on leimattu fluoresoivalla merkkiaineella. Sekundääristen vasta-aineiden liuosta pipetoidaan 200 µl kaivoa kohti. Liuoksessa on PBS:ssä 1 % BSA ja sekundäärinen vasta-aine anti-goat 568nm (1:800, Life Technologies Ltd A11057). Tämän liuoksen annetaan vaikuttaa tunti valolta suojattuna huoneenlämmössä.

Sekundääristen vasta-aineiden liuos pipetoidaan pois ja kaivot pestään kolme kertaa 5 minuuttia 300 µl PBS. Sitten kaivot pestään 2 kertaa 5 minuuttia PBS:llä eli fosfaattipuskurilla. Tämän jälkeen kaivot kuivataan ja peitetään 10 µl Vectashieldillä, jossa mukana on tumaväriaine DAPI (Vector Laboratories Inc., USA). Lopuksi kaivot viedään säilytykseen 4 °C:een valolta suojattuna.

Värjättyt solut tutkitaan fluoresoivaa optiikkaa hyväksikäyttävällä mikroskoopilla Olympus IX51 ja kuvataan Olympus DP30BW kameralla.

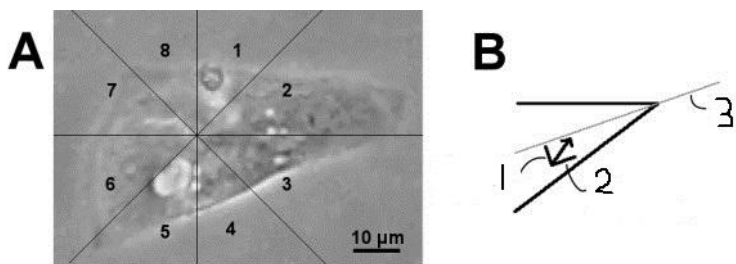
2.5 Videoanalyysi

Kantasoluista erilaistettuja sykkiviä sydänlihassoluja voidaan tarkastella ja videoida mikroskoopin avulla. Kuvauksessa solukaivot ovat lämpölevyn päällä, koska lämpötilan lasku vaikuttaa solun sykkimiseen. Mikroskooppi on Nikon eclipse TS100 ja digitaalinen videokamera Optika DIGI-12, Optika Microscopes. Yksi video kestää 60 sekuntia ja videossa on 60 kuvaa sekunnissa. Videot voidaan analysoida yksitellen MQD-metodiin (39) (minimum quadratic difference) perustuvalla Beatview -analyysiohjelmalla, joka mittaa solun mekaanisen toimintakierron eri vaiheiden kestot ja solun supistumistiheyden (40).

Aluksi solu rajataan silmämääräisesti niin, että mahdolliset huonosti tai ei ollenkaan sykkivät alueet jäävät pois häiriöiden minimoimiseksi. Lisäksi solulle visuaalisesti arvioidaan focus point, kohta, jota kohti sykkiminen näyttää suuntautuvan. (40)

Analyysiohjelma jakaa solun 8 sektoriin, joista jokainen suuntautuu 45 astetta focus pointista. Jokaiselle sektorissa olevalle nopeusvektorille lasketaan tangentialinen ja radiaalinen komponentti. Radiaalinen komponentti lasketaan sektorin keskilinjan suhteen ja tangentialinen komponentti sektorin keskilinjan normaalin suhteen. Lopputuloksena saadaan 16 erilaista signaalia: 8 radiaalista ja 8 tangentialista komponenttia. (39, 40)

16:sta signaalista valitaan 3 edustavinta, jotka kuvaavat hyvin solua eikä esimerkiksi taustakohina ole mittavaa. Näistä kolmesta valitusta signaalista ohjelma laskee solulle sykehdyksen keston vaiheet: supistuksen kesto (contraction duration), aika supistuneena (contraction end-relaxation start), relaksaation kesto (relaxation duration), relaksaation jälkeiset aktivaatiot (post-relaxation activity) ja aika relaksaation loppumisesta seuraavan supistuksen alkuun (relaxation end-next contraction start). Myös supistumistiheys lasketaan. (40)



Kuva 7. Havainnollistus solun jakamisesta sektoreihin sekä tangentialisesta ja radiaalisesta komponentista. Kohdassa B: 1= tangentialinen komponentti, 2= radiaalinen komponentti, 3= sektorin keskilinja. Mukailtu artikkelista Aho-la A, Kiviaho AL, Larsson K, Honkanen M, Aalto-Setälä K, Hyttinen J. Video image-based analysis of single human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocyte beating dynamics using digital image correlation. Biomedical engineering online 2014;13(1):39.

2.6 Tilastollinen analyysi

Tilastolliset testit (Mann-Whitney U-testi, jota tulee käyttää epäparametrisille, riippumattomille muuttujille) ja laskelmat (mediaanit epäparametrisille muuttujille ja keskiarvot parametrisesti jakautuneille syketäajuusmuuttujille) on tehty sekä laatikko-janakuvaajat on piirretty käyttäen IBM SPSS Statistics ohjelman versiota 23 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Taulukko ja laatikko-janakuvaajat on tehty kaikista solun toimintakierron vaiheista (supistuminen, supistuneena, relaksaatio, relaksaation loppumisesta seuraavan supistuksen alkuun).

3. TULOKSET

3.1 Videoanalyysi ja tilastollinen testaus

Sydänlihassolu sykkii videolla kauttaaltaan tasaisesti ja säännönmukaisesti. Solut ovat yksittäin tai rykelmissä.

Kummankin mutaation Fin A ja Fin B solut pysyvät supistuneina terveitä verrokkisoluja pidempään ja mutaation Fin B solut relaksoituvat nopeammin (Taulukko 2). Verrokkisolut relaksoituvat heti supistuksen jälkeen, sairait solut eivät. Mutaatiota Fin A kantavat solut pysyvät supistuneina kauimmin (mediaani 32,1 millisekuntia) ja mutaatiota Fin B kantavat solut myös pidempään (mediaani 17,1 millisekuntia) kuin verrokkisolut.

Taulukko 2. Solun toimintakierron eri aikojen mediaanit sekä syketaajuuksien keskiarvot ryhmiteltyinä mutaation mukaan.

	Supistuminen (ms)	Supistuneena (ms)	Relaksaatio (ms)	Relaksaation loppumisesta seuraavan supis- tuksen alkuun (ms)	Syketaajuuden keskiarvo (lyön- tiä/minuutti)
UTA.04602.WT	187,2	0,00	279,9	960,6	45,6
Mutaatio Fin A	149,4	32,1	266,7	947,7	44,7
Mutaatio Fin B	126,4	17,1	171,0	764,4	59,0

Taulukossa 3 on esitetty yksittäisten solulinjojen supistustoimintaa. Solulinjoista pisimpään supistuneena pysyy linja UTA.00211.LQT1 (Fin A -mutaatio) (mediaani 115,2 millisekuntia), ja tämän linjan soluilla kuluu pisin aika relaksaation loppumisesta seuraavan supistuksen alkuun (mediaani 1857,6 millisekuntia). Pienmolekyylierilaistetut verrokkilinjan UTA.04602.WT:n solut muistuttavat käyttäytymiseltään (supistuneena-ajan mediaani 56,5) enemmän sairaita solulinjoja kuin END2-erilaistuksella erilaistettuja verrokkilinjan UTA.04602.WT soluja. Näiden solujen syketaajuuksien keskiarvo oli myös matalin (16,3 lyöntiä/minuutti), josta suurin osa poikkeavista arvoista johtuu. Solulinjan UTA.00303.LQT1 solut muistuttavat toiminnaltaan (supistuneena-ajan mediaani 12,6 millisekuntia) eniten terveitä verrokkilinjan UTA.04602.WT soluja eli käyttäytyvät terveimmin sairaita solulinjoista. UTA.00303.LQT1 on ainoa solulinja, joka on peräisin oireettomalta potilaalta (potilas 2).

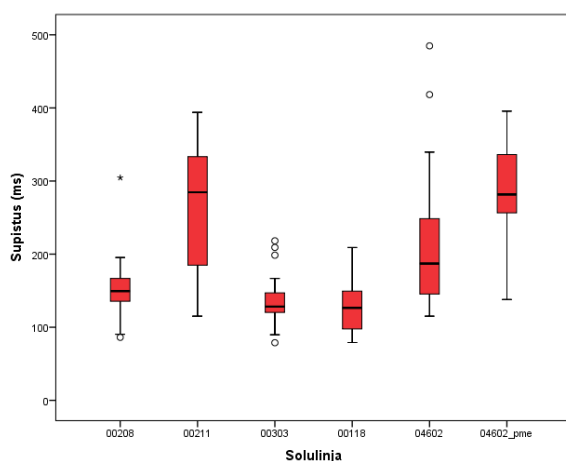
Taulukko 3. Solun toimintakierron eri aikojen mediaanit sekä syketaajuuksien keskiarvot ryhmiteltyinä solulinjoittain. UTA.04602.WTpme = pienmolekyylierilaistetut verrokkilinjan solut.

	Supistuminen (ms)	Supistuneena (ms)	Relaksaatio (ms)	Relaksaation loppumisesta seuraavan supistuksen alkuun (ms)	Syketaajuuden keskiarvo (lyöntiä/minuutti)	Solujen lukumäärä
UTA.04602.WT	187,2	0,00	279,9	960,6	45,6	30
UTA.04602.WTpme	281,6	56,5	378,5	3724,1	16,3	7
UTA.00208.LQT1	148,2	39,5	257,1	798,9	49,2	22
UTA.00211.LQT1	284,7	115,2	464,8	1857,6	25,1	16
UTA.00303.LQT1	128,2	12,6	227,3	762,8	54,2	23
UTA.00118.LQT1	126,4	17,1	171,0	764,4	59,0	14

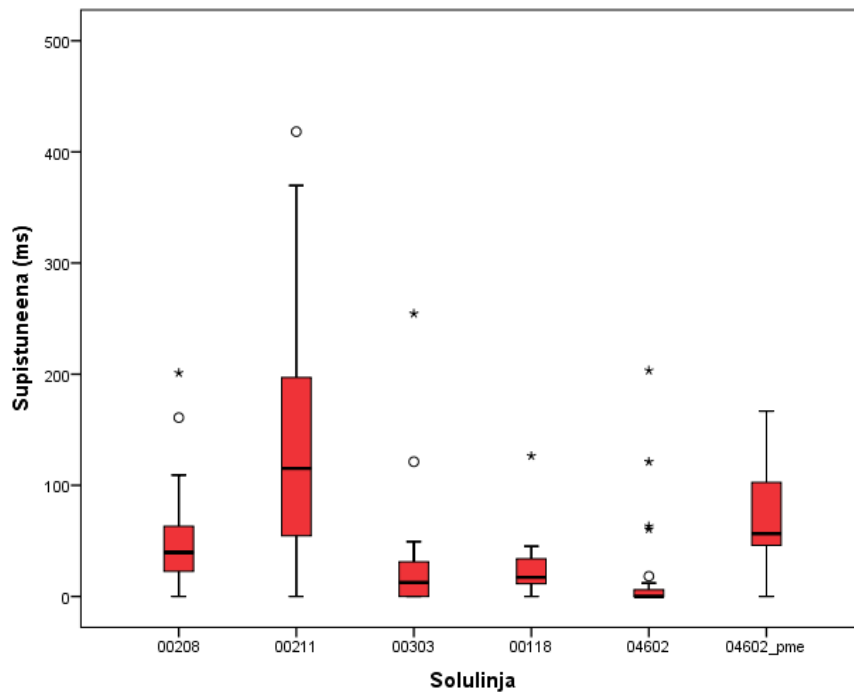
Potilaan 2 solut (solulinja UTA.00303.LQT1, mutaatio Fin A, oireeton potilas) ovat toiminnaltaan (supistuneena-ajan mediaani 12,6 millisekuntia) lähimpinä terveitä verrokkilinjan soluja. Potilaan 3 (solulinja UTA.00118.LQT1, mutaatio Fin B, potilaalla huimausta, näköoireita ja synkopeekohtauksia) solut pysyvät supistuneina (supistuneena-ajan mediaani 17,1 millisekuntia) verrokkisoluja pidempään ja ne relaksoituvat koko aineiston soluista nopeimmin (relaksaatioajan mediaani 171,0 millisekuntia). Potilaan 1 (solulinjat UTA.00208.LQT1 ja UTA.00211.LQT1, mutaatio Fin A, potilaalla synkopeekohtauksia) solut käyttäytyvät viallisimmin, ne pysyvät supistuneena kaikista sairasta solulinjoista pisimpään (supistuneena-ajan mediaani 56,2 millisekuntia).

Taulukko 4. Solun toimintakierron eri aikojen mediaanit ryhmiteltyinä potilaan mukaan ja END2-erilaistettujen verrokkikilnjan UTA.04602WT solut.

	Supistuminen (ms)	Supistuneena (ms)	Relaksaatio (ms)	Relaksaation loppumisesta seuraavan supistuksen alkuun (ms)	Potilaan oi- reet	Solujen lu- kumäärä
UTA.04602. WT	187,2	0,00	279,9	960,6	verrokki	30
Potilas 1 (Fin A - mutaatio)	165,3	56,2	296,0	1179,5	synkopeekohta- uksia	38
Potilas 2 (Fin A - mutaatio)	128,2	12,6	227,3	762,8	oireeton	23
Potilas 3 (Fin B - mutaatio)	126,4	17,1	171,0	764,4	huimausta, näkö- häiriöitä, synko- peekohtauksia	14



Kuva 8. Laatikko-janakuvaaja supistuksen kestosta solulinjoittain. Vaaka-akselilla on solulinja solulinjan numeron mukaan, eli esimerkiksi 00208 tarkoittaa solulinjaa UTA.00208.LTQ1. Vaaka-akselilla vasemmalta oikealle ensin ovat potilaan 1 solulinjat (00208 ja 00211), sitten potilaan 2 solulinja (00303), sitten potilaan 3 solulinja (00118), sitten END2-erilaistettu verrokkisolulinja (04602), viimeisenä oikealla piemolekyylierilaistettujen verrokkikilnjan solut (04602_pme)

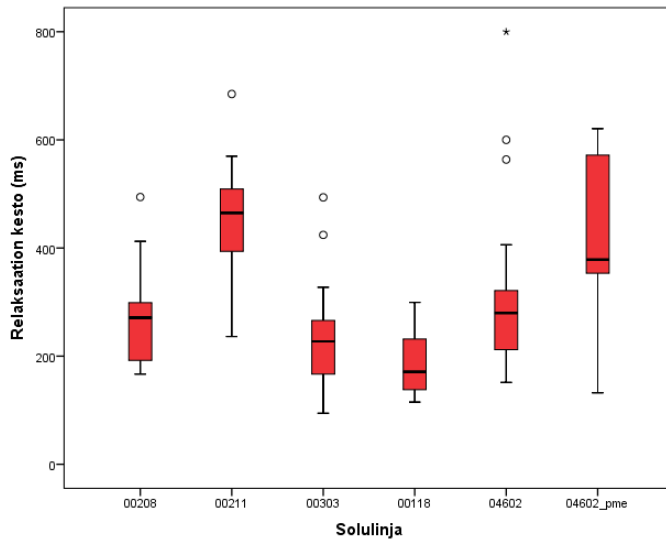


Kuva 9. Laatikko-janakuvaaja supistuneena pysymisestä solulinjoittain. Vaaka-akselilla on solulinja solulinjan numeron mukaan, eli esimerkiksi 00208 tarkoittaa solulinjaa UTA.00208.LQT1. Vaaka-akselilla vasemmalta oikealle ensin ovat potilaan 1 solulinjat (00208 ja 00211), sitten potilaan 2 solulinja (00303), sitten potilaan 3 solulinja (00118), sitten END2-erilaistettu verrokkisolulinja (04602), viimeisenä oikealla piemolekyylierilaiset verrokkilinjan solut (04602_pme)

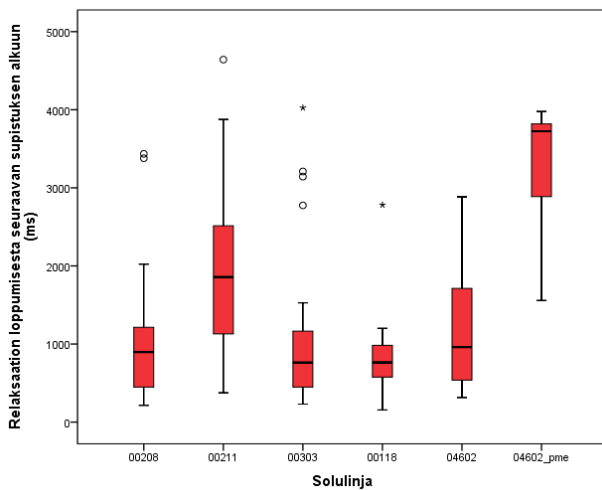
Supistuneena pysymisessä on tilastollisesti merkittävä ero verrattuna terveeseen solulinjaan UTA.04602.WT jokaisella sairaalla solulinjalla, paitsi linjalla UTA.00303.LQT1. UTA.00208.LQT1 $p=0,0006$, UTA.00118.LQT1 $p=0,008$. UTA.00211.LQT1 $p=0,00001$, UTA.00303.LQT1 $p=0,0978$ Mann-Whitney U-testillä (Kuva 9 ja Taulukko 5). Lisäksi samalta potilaalta (potilas 1) peräisin olevien solulinjojen UTA.00208.LQT1 ja UTA.00211.LQT1 solujen supistuneena pysymisessä on tilastollisesti merkittävä ero ($p=0,008$).

Taulukko 5. Mann-Whitney U- testillä saadut p-arvot supistuneena pysymisestä siten, että tervettä verrokkilinjaa UTA.04602.WT on yksitellen testattu jokaisen sairaan solulinjan kanssa.

Mann-Whitney U-testi	UTA.00208.LQT1	UTA.00211.LQT1	UTA.00303.LQT1	UTA.00118.LQT1
UTA.04602.WT	$p=0,0006$	$p=0,00001$	$p=0,0978$	$p=0,008$



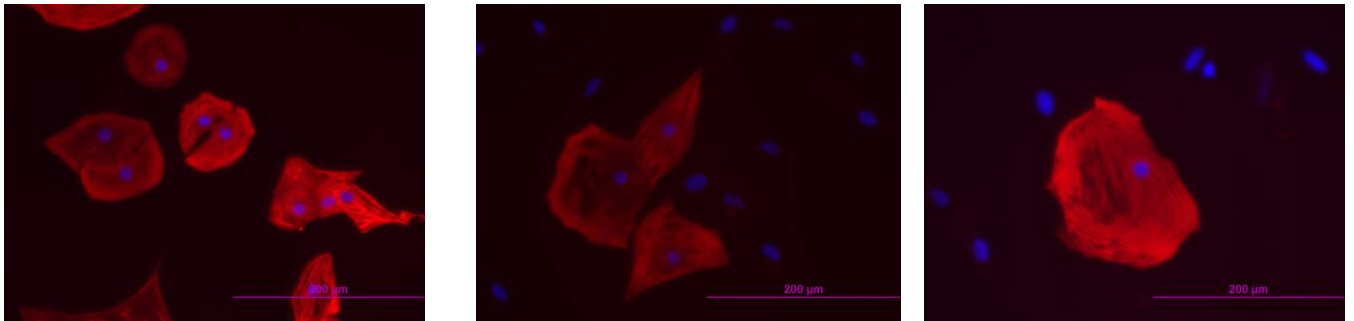
Kuva 10. Laatikko-janakuvaaja relaksaation kestosta solulinjoittain. Vaaka-akselilla on solulinja solulinjan numeron mukaan, eli esimerkiksi 00208 tarkoittaa solulinjaa UTA.00208.LTQ1. Vaaka-akselilla vasemmalta oikealle ensin ovat potilaan 1 solulinjat (00208 ja 00211), sitten potilaan 2 solulinja (00303), sitten potilaan 3 solulinja (00118), sitten END2-erilaistettu verrokkisolulinja (04602), viimeisenä oikealla piemolekyylierilaistetut verrokkilinjain solut (04602_pme)



Kuva 11. Laatikko-janakuvaaja relaksaation loppumisesta seuraavan supistuksen alkuun solulinjoittain. Vaaka-akselilla on solulinja solulinjan numeron mukaan, eli esimerkiksi 00208 tarkoittaa solulinjaa UTA.00208.LTQ1. Vaaka-akselilla vasemmalta oikealle ensin ovat potilaan 1 solulinjat (00208 ja 00211), sitten potilaan 2 solulinja (00303), sitten potilaan 3 solulinja (00118), sitten END2-erilaistettu verrokkisolulinja (04602), viimeisenä oikealla piemolekyylierilaistetut verrokkilinjain solut (04602_pme)

3.2 Immunovärjäys

Analysoidut ja värjättyt verrokkilinjan UTA.04602.WT solut ovat sydänlihassoluja, koska niissä on paljon sydänlihassoluille ominaista troponiini T:tä ja selkeät tumat. Osassa soluista näkyy useita tumia, mikä on tyypillistä sydänlihassoluille (41). Alustoilla on myös muita soluja, koska kuvissa nähdään tumia soluista, joissa ei ole troponiini T:tä.



Kuva 12. Immunovärjättyjä solulinjan UTA.04602.WT soluja. Punainen väri edustaa troponiini T:tä ja sininen väri tumaa. Sarkomeerirakenteita, joiden osa troponiini T on, nähdään myös.

4. POHDINTA

Tutkimuksessa verrattiin videoanalyysimenetelmällä terveiden iPS-soluista erilaistettujen sydänlihassolujen mekaanista supistustoimintaa ja sairaiden, pitkä QT1 -geenivirhettä kantavien iPS-soluista erilaistettujen sydänlihassolujen mekaanista supistustoimintaa. Tätä asiaa on tutkimusryhmän toimesta tutkittu jo aiemmin (1) ja tulos on, että terveet ja sairaat solut eroavat toisistaan elektrofysiologisilta ja mekaanisilta ominaisuuksiltaan. Tässä tutkimuksessa tutkittiin ilmiön toistettavuutta suuremmalla solumäärällä sekä ilmiön vastaavuutta potilaiden kliiniseen taudinkuvaan. Lopputulos on, että mekaanisen toiminnan poikkeavuus säilyy myös suurempaa solumäärää tarkasteltaessa ja solujen toiminnan erot vastaavat potilaiden kliinistä taudinkuvaa.

Yleisesti LQTS-potilailla EKG:ssä on pidentynyt QT-intervalli. Jokaisessa EKG-rekisteröinnissä sitä ei kuitenkaan aina löydetä, eikä pidentynyt QT-intervalli ole edellytys oireyhtymän diagnoosille. Tässä tutkimuksessa potilailla 1 ja 3 on pidentynyt QT-intervalli, potilaan 2 QT-intervalli on normaali mutta hänelläkin on LQT1 diagnoosi, koska hänellä tiedetään olevan sairauden aiheuttava mutaatio (Fin A -mutaatio). Koko sydäimestä QT-intervalli kuvastaa aikaa kammioden depolarisaation alkamisesta kammioden repolarisaation loppuun (Kuva 6). LQT1:ssä poikkeavuus on yleisimmin juuri kammio repolarisaatiota kuvaavassa T-aallossa (kanta leveä), koska sairauden takana on poikkeavuus juuri repolarisoivassa I_{Ks} -ionikanavassa (Kuva 5) (33). Mekaanisesti koko QT-intervalli vastaa aikaa kammiosupistuksen alusta kammio relaksaation loppuun. Videoanalyysiohjelma ei anna yksittäisen solun mekaanisesta toiminnasta täysin suoraan QT-intervallia vastaavaa aikaa, mutta käyttökelpoisin saatu suure on solun pysyminen supistuneena, koska sen pitkittyminen koko sydämen tasolla johtaisi QT-intervallin pitenemiseen. Tuloksissa onkin eroja terveiden ja sairaiden solujen välillä; sairaiden solulinjojen solut pysyvät supistuneina verrokkisoluja pidempään, eli sairaiden solujen relaksaation alku on häiriintynyt. Pistemutaation Fin A kantavat solut (linjat UTA.00208.LQT1, UTA.00211.LQT1, UTA.00303.LQT1) pysyvät verrokkeja pidempään supistuneina (Taulukko 2 ja Kuva 6) ja ero on myös tilastollisesti merkitsevä. Linjan UTA.00303.LQT1 solut, jotka ovat oireettomalta potilaalta 2, käyttäytyvät sairaista solulinjoista vähiten epänormaalisti (ero supistuneena pysymisessä ei ole tilastollisesti merkitsevä verrattuna terveeseen verrokkilinjaan). Linjat UTA.00208.LQT1 ja UTA.00211.LQT1 ovat samalta potilaalta, mutta jälkimmäisen linjan solut pysyvät kauemmin supistuneina ja ero on tilastollisesti merkitsevä. Intronimutaatiota Fin B kantavat solut (linja UTA.00118.LQT1) pysyvät supistuneina tilastollisesti merkittävästi kauemmin kuin verrokkilinjan solut, mutta eivät aivan niin kauaa kuin Fin A -mutaation solut (Taulukko 2 ja Kuva 6). Linjan UTA.00118.LQT1 solut eli intronimutaation Fin B solut relaksoituvat jostain syystä hieman kaikkia muita soluja nopeammin (Taulukko 2 ja Taulukko 3). Pienmolekyyli-erilaistetut verrokkilinjan UTA.04602.WTpme solut muistuttavat mekaanisilta ominaisuuksiltaan enemmän sairaita soluja (Taulukko 3) kuin muita END2-erilaistettuja verrokkilinjan UTA.04602.WT soluja.

On mielenkiintoista, että samalta potilaalta 1 (QT-aika 464 millisekuntia) peräisin olevat solulinjojen UTA.00208.LQT1 ja UTA.00211.LQT1 solut käyttäytyvät eri tavalla; jälkimmäisen linjan solut

pysyvät pidempään supistuneina ja ero on tilastollisesti merkittävä. Tämä voi liittyä solulinjakohtaisiin eroihin, joita iPS-tautimallinnukseen liittyy aina (20). On havaittu, että solulinjojen ylläpito-olosuhteet ja solujen tuottamien endogeenisten kasvutekijöiden määrät vaihtelevat solulinjoittain aiheuttaen eroa eri linjojen solujen erilaistumiskykyyn (42). Lisäksi on havaittu, että iPS-soluilla on epigeneettisiä jäänteitä (esimerkiksi DNA:n metylaatiokohtia) niistä somaattisista soluista, joista ne on uudelleen ohjelmoitu (43). Tällaiset epigeneettiset jäänteet promotoivat erilaistumista alkuperäistä solua muistuttaviksi soluiksi (43). Nämä asiat tulee ottaa huomioon ja erottaa todellisesta sairautteen liittyvästä ilmiästä (44). Epigenetiikka ei ole tässä tutkimuksessa todennäköinen selittäjä potilaan 1 solulinjojen (linjat UTA.00208.LQT1 ja UTA.00211.LQT1) välisissä eroissa, koska kummankin linjan alkuperäinen solu on ollut ihon fibroblasti. Solujen tuottamien omien kasvutekijöiden määrä voi kuitenkin olla selittävä tekijä. Toisaalta myös potilailta mitattaessa QT-aikaa EKG:stä eri mittauskertojen välillä on eroa (34), joten on mahdollista, että tämä solulinjojen ero heijastelee myös potilaalla kliinisesti havaittavaa QT-ajan vaihtelua. Asiaa voidaan tulevaisuudessa tutkia lisää tekemällä saman potilaan soluista useampia iPS-solulinjaklooneja, jotka erilaistetaan ja otetaan mukaan tutkimukseen, tämä toisaalta kasvattaa työmäärää huomattavasti.

Potilaalla 3 (linja UTA.00118.LQT1) on pisin QT-aika (489 millisekuntia), mutta silti potilaan 1 solut pysyvät pidempään supistuneina sekä linjoittain (Taulukko 3) että potilastasolla (Taulukko 4). Potilaalla 3 on myös ollut monipuolisempia oireita kuin vain potilaalla 1 olleita synkopeekohtauksia, potilaalla 3 on ollut myös huimausta ja näkökenttäoireita (Taulukko 1). Tältä osin tutkimuksen tulokset eivät kohtaa täysin potilaiden oireiden kanssa; olisi voinut olettaa että potilaan 3 solut käyttäytyisivät sairaimmalla tavalla eli pysyisivät pisimpään supistuneina, koska potilaalla 3 on pisin QT-aika ja monipuolisimmat oireet. Tosin on mahdollista, että ihmisyksilössä jokin kompensoi koko sydämen tasolla sairautta, jolloin oireet voivat olla lievemmat (19). Lisäksi LQT1-potilailla erityistilanteet kuten fyysinen rasitus tai tunnekuuhu (34) saattavat saada aikaan QT-ajan poikkeavuutta ja muutoin QT-aika voi olla normaali. Tutkimuksessa yksittäiset solut ovat kuitenkin normaalitilanteessa koko ajan eivätkä erityisen rasituksen alaisina, joten sairauden mahdollisesti rasituksessa korostuva ilmiäsu (pidentyvä supistuneena pysyminen) jää piiloon. Asiaa voi tulevaisuudessa tutkia tekemällä testausta esimerkiksi adrenaliinilla stimuloituilla soluilla. Potilailla 1 ja 3 on myös soluissaan eri mutaatiot (Taulukko 1). Potilaalla 1 on pistemutaatio Fin A, jonka on ajateltu vaikuttavan I_{KS} -ionikanavan toimintaan vain vähän heikentämällä kanavan kuljetusta solukalvolle (32, 45), potilaalla 3 on intronimutaatio Fin B, joka on liitetty I_{KS} -ionikanavan täydelliseen toiminnanmenetykseen (46). Eli tässäkin on ristiriita, kirjallisuudenkin mukaan olisi voinut olettaa, että potilaan 3 (Fin B -mutaatio) solut käyttäytyvät sairaiten. Tulokseni eivät siis kuitenkaan tue sitä, että mutaatio Fin A olisi vaikutuksiltaan lievempi kuin mutaatio Fin B (Taulukko 2).

Oireettoman potilaan 2 soluista peräisin olevat sydänlihassolut pysyvät verrokkisoluja pidempään supistuneina (Taulukko 4), mutta ero verrokkisoluihin ei ole tilastollisesti merkittävä (Taulukko 5). Potilaan 2 solujen keskimääräinen syketaajuus ei eroa merkittävästi verrokkisolujen keskimääräisestä syketaajuudesta (Taulukko 3). Potilaan 2 solut käyttäytyvät sairaiden solulinjojen soluista terveimmällä tavalla eli relaksaation alku on vähiten viivästynyt (Taulukko 4), mikä sopii potilaiden kliiniseen kuvaan, koska potilas 2 on oireeton ja QTc on normaali ja potilaat 1 ja 3 ovat oireilleet ja QTc:t ovat poikkeavan pitkiä (Taulukko 1). Normaalisti supistumistaajuuden kasvaessa supistusnopeus kasvaa ja käänteisesti supistumistaajuuden laskiessa supistuksen nopeus pienenee (47).

Videoanalyysi on hyvä menetelmä yksittäisen solun supistustoiminnan tutkimiseen (19, 40). Analyysiohjelma ei vielä kyennyt käsittelemään jälkidepolarisaatioita, joita myös liittyy LQT1-oireyhtymään (30). Jälkidepolarisaatiot ovat solun epänormaalia sähköistä toimintaa ja ne voivat laukaista lisälyöntejä (48). Jälkidepolarisaatioita olisi mielenkiintoista havainnoida, koska elintasolla niiden aikaansaamat lisälyönnit voivat käynnistää kääntyvien kärkien kammiotakykardian, johon liittyy riski hengenvaarallisen kammiovärinän kehittymisestä (30). Videoanalyysimenetelmän käyttöön liittyy satunnaisvirhettä, koska solun sykkivä alue rajataan ja sykinän kohdepiste valitaan silmämääräisesti (40). Lisäksi analyysiin otettavaa kolmea signaalia joudutaan välillä manuaalisesti korjaamaan, mistä myös aiheutuu satunnaisvirhettä.

Pienmolekyylierilaistetuista verrokkilinjan UTA.04602.WT kuuluvista soluista sai analysointikelpoisen videon analyysiin mukaan vain seitsemästä solusta, otos on niin pieni, että sitä on hankalaa tarkastella ja vertailla muihin ryhmiin. Analysoidut seitsemän solua muistuttavat enemmän sairaita soluja kuin muita terveitä END2-erilaistettuja solulinjan UTA.04602.WT soluja (Taulukko 3), tosin syketaajuudessa ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa vaikkakin pienmolekyylierilaistettut solut sykkivät poikkeuksellisen hitaasti (Taulukko 3). END2-erilaistuksessa olosuhteet muistuttavat sikiökehityksen olosuhteita muun muassa viskeraalisen endodermin solujen ja erilaistuvien solujen soluvuorovaikutusten osalta (14). Pienmolekyylierilaistuksessa estetään kahta sydämen kehitystä estävää signaalireittiä kahdella synteettisellä molekyylillä, jotka saattavat olla soluille toksisia tietämättämme (16,17), joten END2-erilaistukseen verrattuna olosuhteet ovat keinotekoisemmat pienmolekyylierilaistuksessa. Tästä voi seurata, että muutoinkin erilaistuksessa osittain puutteelliseksi jäävät solurakenteet, kuten T-tubulukset (27) jäävät pienmolekyylierilaistetuissa soluissa END2-erilaistettuja soluja puutteellisemmiksi. Lisäksi pienmolekyylierilaistuksessa solut erilaistuvat yksisolumatossa (16, 17) ja END2-erilaistuksessa kolmiulotteisesti (14, 15), tämä voi vaikuttaa siten, että solun morfologia kehittyy paremmin END2-erilaistuksessa. Nämä asiat saattavat selittää sitä, miksi pienmolekyylierilaistettut verrokkisolut tässä tutkimuksessa käyttäytyivät sairaiden solujen tavoin.

iPS-soluista erilaistettut sydänlihassolut eivät ole täydellisiä, vaan epäkypsiä rakenteeltaan ja toiminnaltaan (20, 27), mikä voi selittää sitä, että myös verrokkilinjan soluista pieni osa käyttäytyi epänormaalisti. Epäkypsyyttä on havaittu solujen morfologiassa, T-tubulusrakenteissa sekä sarkomeereissa (27). Samalla nousee esiin koko tautimallinnustapaa koskeva haaste, eli kuinka iso osa sairaiden solujen toiminnan vioista johtuu siitä, että solut ovat epäkypsiä verrattuna aikuisen ihmisen sydänlihassoluihin (49). Erilaistetuista sydänlihassoluista voidaan tutkia esimerkiksi lepokalvopotentiaalia ja aktiopotentiaalin voimakkuutta solun kypsytyden arvioimiseksi (19, 49). Solujen kypsytyden aste voi selittää sitä, miksi tuloksissani samaa mutaatiota kantavien solulinjojen soluissa on vaihtelua.

Tässä tutkimuksessa ei selvitetty, olivatko tutkitut solut eteissolutyyppejä, kammiosolun tyyppisiä vai johtoratajärjestelmän solujen tyyppisiä soluja. Kammiosoluilla on negatiivisin lepopotentiaali, nopein ja voimakkain depolarisaatio ja tasannevaihe repolarisaatiossa (21, 50). Eteissoluilla ei ole kammiosoluille tyypillistä tasannevaihetta repolarisaatiossa (21, 50). Johtoratajärjestelmän solujen lepopotentiaali on vähemmän negatiivinen kuin eteis- tai kammiosoluilla ja aktiopotentiaali on hitaampi (21, 50). Jos pisimpään supistuneina pysyeneen solulinjan eli solulinjan UTA.00211.LQT1 soluista suurempi osa olikin ventrikulaarisia soluja kuin muiden solulinjojen soluista, niin repolari-

saation tasannevaiheen olemassaolo voi viivästyttää mekaanisen relaksaation alkua vielä enemmän kuin pelkkä häiriö I_{KS} -kanavassa. I_{KS} -kanava aukeaa normaalisti repolarisaation tasannevaiheen aikana ja pysyy auki nopean repolarisation ajan (Kuva 5). Solujen alatyypin olisi mielenkiintoista tietää, jotta voidaan verrata samantyyppisiä soluja keskenään.

Videoanalyysimenetelmästä saatava solun toimintakierron vaihe ”relaksaation loppumisesta seuraavan supistuksen alkuun” (Kuva 11) ei ole merkityksellinen LQT1:tä tutkittaessa, koska se on voimakkaasti riippuvainen syketaajuudesta eikä I_{KS} -ionikanavan toiminta vaikuta siihen (I_{KS} sulkeutuu solun repolarisaation loputtua (Kuva 5)).

Videoanalyysimenetelmällä havaitaan erot terveiden verrokkisolujen ja sairaiden, pitkä QT1-oireyhtymän geenimutaatiota kantavien solujen välillä (19). Johtopäätökseni on, että mutaatiot Fin A ja Fin B heikentävät sydänlihassolun I_{KS} -kaliumionikanavan toimintaa siten, että relaksaation alku viivästyy. Relaksaation alun viivästyminen on tilastollisesti merkittävää oireilevien potilaiden soluista peräisin olevissa sydänlihassoluissa. Yhden oireettoman potilaan soluista peräisin olevat sydänlihassolut pysyvät keskimäärin pidempään supistuneina (mutta kuitenkin vähemmän kuin oireellisten potilaiden solut), mutta ero verrokkilinjain soluihin ei ole tilastollisesti merkittävä. Videoanalyysiohjelmaa on tarpeen kehittää siten, että sillä kyetään analysoimaan videoita myös sellaisista soluista, joiden mekaaninen toiminta on puutteellisinta. Videoanalyysiin on syytä yhdistää muitakin tutkimusmenetelmiä, kuten patch clampia ja kalsiumkuvantamista, jotta saadaan laaja käsitys solun elektrofysiologiasta aina kalsiumaineenvaihduntaan ja mekaaniseen toimintaan saakka sekä identifioitua sydänlihassolun alatyypin (eteissolu, kammiosolu, johtoratajärjestelmän solu), koska alatyypin elektrofysiologiassa on eroja (21, 50). Tulevaisuudessa voidaan jatkaa vielä suurempiin solumääriin ja linjakohtaisten erojen tutkimukseen sekä lääketestaukseen (18).

Potilasspesifisyys on iPS-soluihin perustuvan tautimallinnuksen etu, jota aiemmin ei ole kyetty saavuttamaan esimerkiksi eläintautimalleilla. iPS-solujen avulla voidaan mallintaa tiettyä sairautta turvallisesti laboratorio-olosuhteissa sekä kehittää ja tutkia lääkkeitä personoidusti. Esimerkiksi lääkeaineiden vaikutusta on jo tutkittu yhdistäen tietoa solu- ja potilastason testauksesta (51). Tulevaisuuden tavoitteena iPS-soluihin perustuvalla teknologialla on sydäntautien alalla regeneratiivinen lääketiede eli esimerkiksi sydänlihaskudossiirteiden kehittäminen.

LÄHTEET

- (1) Kiviaho Anna. Long QT Syndrome-specific Cardiomyocytes Derived from Induced Pluripotent Stem Cells, From cell lines to disease models University of Tampere; 2014.
- (2) Hoffman LM, Carpenter MK. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005 Jun;23(6):699-708.
- (3) Yamanaka S, Li J, Kania G, Elliott S, Wersto RP, Van Eyk J, et al. Pluripotency of embryonic stem cells. *Cell Tissue Res* 2008 Jan;331(1):5-22.
- (4) Choumerianou DM, Dimitriou H, Kalmanti M. Stem cells: promises versus limitations. *Tissue Eng Part B Rev* 2008 Mar;14(1):53-60.
- (5) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 Nov 30;131(5):861-872.
- (6) Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007 Jul 19;448(7151):313-317.
- (7) Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016 Mar;17(3):183-193.
- (8) Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009;85(8):348-362.
- (9) Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, et al. Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem* 2011 Feb 11;286(6):4760-4771.
- (10) Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008 Nov 7;322(5903):945-949.
- (11) Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009 May 8;324(5928):797-801.
- (12) Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010 Nov 5;7(5):618-630.
- (13) Hayashi Y, Furue MK. Biological Effects of Culture Substrates on Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int* 2016;2016:5380560.

- (14) Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 2003 Jun 3;107(21):2733-2740.
- (15) Pekkanen-Mattila Mari. *Cardiomyocyte Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells* University of Tampere; 2010.
- (16) Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc* 2013 Jan;8(1):162-175.
- (17) http://www.oppiporrti.fi/op/kbi00027/do?p_haku=wnt#q=wnt. Luettu 2.5.2017.
- (18) Hoekstra M, Mummery CL, Wilde AA, Bezzina CR, Verkerk AO. Induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes as models for cardiac arrhythmias. *Front Physiol* 2012 Aug 31;3:346.
- (19) Kiviahho A, Ahola A, Larsson K, Penttinen K, Swan H, Pekkanen-Mattila M, Venäläinen H, Paavola K, Hyttinen J, Aalto-Setälä K. Distinct electrophysiological and mechanical beating phenotypes of long QT syndrome type 1-specific cardiomyocytes carrying different mutations. *IJC Heart & Vasculature* 2015;8:19-31.
- (20) Moretti A, Laugwitz KL, Dorn T, Sinnecker D, Mummery C. Pluripotent stem cell models of human heart disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013 Nov 1;3(11):10.1101/cshperspect.a014027.
- (21) Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, et al. Functional Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation Research* 2009 Feb 27;104(4):e41.
- (22) Moretti A, Bellin M, Welling A, Jung CB, Lam JT, Bott-Flugel L, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2010 Oct 7;363(15):1397-1409.
- (23) Aalto-Setälä K, Conklin BR, Lo B. Obtaining consent for future research with induced pluripotent cells: opportunities and challenges. *PLoS Biol* 2009 Feb 24;7(2):e42.
- (24) Milani-Nejad N, Janssen PM. Small and large animal models in cardiac contraction research: advantages and disadvantages. *Pharmacol Ther* 2014 Mar;141(3):235-249.
- (25) <http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2001/20010101>. Luettu 9.5.2017.
- (26) Sallam K, Li Y, Sager PT, Houser SR, Wu JC. Finding the rhythm of sudden cardiac death: new opportunities using induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res* 2015 Jun 5;116(12):1989-2004.
- (27) Lieu DK, Liu J, Siu CW, McNerney GP, Tse HF, Abu-Khalil A, et al. Absence of transverse tubules contributes to non-uniform Ca(2+) wavefronts in mouse and human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells Dev* 2009 Dec;18(10):1493-1500.
- (28) Pekkanen-Mattila M, Chapman H, Kerkelä E, Suuronen R, Skottman H, Koivisto A, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: demonstration of a portion of cardiac cells

with fairly mature electrical phenotype. *Experimental Biology and Medicine* 2010 Apr;235(4):522-530.

(29) Tsuji K, Akao M, Ishii TM, Ohno S, Makiyama T, Takenaka K, et al. Mechanistic basis for the pathogenesis of long QT syndrome associated with a common splicing mutation in KCNQ1 gene. *J Mol Cell Cardiol* 2007 Mar;42(3):662-669.

(30)

http://www.oppiporrti.fi/op/kak01229/do?p_haku=j%C3%A4lkidepolarisaatio#q=j%C3%A4lkidepolarisaatio. Luettu 5.9.2017.

(31) Bartos DC, Grandi E, Ripplinger CM. Ion Channels in the Heart. *Compr Physiol* 2015 Jul 1;5(3):1423-1464.

(32) Piippo K, Swan H, Pasternack M, Chapman H, Paavonen K, Viitasalo M, et al. A founder mutation of the potassium channel KCNQ1 in long QT syndrome: implications for estimation of disease prevalence and molecular diagnostics. *J Am Coll Cardiol* 2001 Feb;37(2):562-568.

(33) http://www.oppiporrti.fi/op/kbi00027/do?p_haku=wnt#q=wnt. Luettu 5.9.2017.

(34) Toivonen L, Swan H, Viitasalo M, Hartikainen J, Happonen J-M, Virtanen V, Koistinen J, Hedman A, Raatikainen P. Pitkä QT –oireyhtymä: kansallinen suositus. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 2008;124(8):902-12.

(35) <http://www.oppiporrti.fi/op/kar01207/do> Luettu 2.11.2017.

(36) <http://www.oppiporrti.fi/op/kar01104/do> Luettu 2.11.2017.

(37) Swan H. Pitkä QT – monimuotoinen oireyhtymä. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 1998;114(19):1905.

(38) Fodstad H, Swan H, Laitinen P, Piippo K, Paavonen K, Viitasalo M, et al. Four potassium channel mutations account for 73% of the genetic spectrum underlying long-QT syndrome (LQTS) and provide evidence for a strong founder effect in Finland. *Ann Med* 2004;36 Suppl 1:53-63.

(39) Gui L, Merzkirch W. A comparative study of the MQD method and several correlation-based PIV evaluation algorithms. *Experiments in Fluids* 2000 Jan;28(1):36-44.

(40) Ahola A, Kiviahho AL, Larsson K, Honkanen M, Aalto-Setälä K, Hyttinen J. Video image-based analysis of single human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocyte beating dynamics using digital image correlation. *Biomedical engineering online* 2014;13(1):39.

(41) <http://www.oppiporrti.fi/op/kar01006/do>. Luettu 2.5.2017

(42) Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, Dubois NC, Niapour M, Hotta A, Ellis J, Keller G. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell* 2011 8: 228–240.

(43) Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LI. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010 467: 285–290.

- (44) Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature Reviews Drug Discovery* 2016 Dec 16;16(2):115-130.
- (45) Aromolaran AS, Subramanyam P, Chang DD, Kobertz WR, Colecraft HM. LQT1 mutations in KCNQ1 C-terminus assembly domain suppress IKs using different mechanisms. *Cardiovasc Res* 2014 Dec 1;104(3):501-511.
- (46) Fodstad H, Bendahhou S, Rougier J, Laitinen-Forsblom PJ, Barhanin J, Abriel H, et al. Molecular characterization of two founder mutations causing long QT syndrome and identification of compound heterozygous patients. *Annals of Medicine* 2006;38(4):294-304.
- (47) http://www.oppiortti.fi/op/kar01016/do?p_haku=syketaajuus#q=syketaajuus. Luettu 5.9.2017.
- (48) <http://www.oppiortti.fi/op/kar01229/do>. Luettu 5.9.2017.
- (49) Yang X, Pabon L, Murry CE. Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res* 2014 Jan 31;114(3):511-523.
- (50) Ma J, Guo L, Fiene SJ, Anson BD, Thomson JA, Kamp TJ, et al. High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011 Nov;301(5):2006.
- (51) Penttinen K, Swan H, Vanninen S, et al. Antiarrhythmic Effects of Dantrolene in Patients with Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia and Replication of the Responses Using iPSC Models. Tereshchenko LG, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0125366. doi:10.1371/journal.pone.0125366.